云 南 植 物 研 究 2002，24（2）：229～234
Acta Botanica Yunnanica

# 吲哚丁酸处理桉树插条后过氧化物酶活性和同工酶变化与插条生根的关系*

黄卓烈[1]，李 明[1]，谭绍满[2]，詹福建[1]，关日强[1]，
巫光宏[1]，林绍湘[1]
（1 华南农业大学生物技术学院，广东 广州 510642；2 华南农业大学林学院，广东 广州 510642）

**摘要**：尾叶桉 MLA 无性系（简称 MLA）为难生根植物，尾叶桉 $U_6$ 无性系（简称 $U_6$）和刚果 12 号桉 $W_5$ 无性系（简称 $W_5$）为相对易生根植物。MLA 的插条中的过氧化物酶（POD）活性较 $U_6$、$W_5$ 的高。用吲哚丁酸（IBA）处理桉树的插条后，在扦插生根的不同阶段，插条内的 POD 活性呈现规律性的变化。蛋白质含量呈上升趋势。POD 同工酶谱带也随生根的进程出现增多的现象。本文讨论了过氧化物酶与桉树插条生根的关系。

**关键词**：过氧化物酶；吲哚丁酸；桉树；扦插生根
**中图分类号**：Q 946，Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2002)02－0229－06

# Study on the Relationship between the Changes of Activities and Isoenzymes of Peroxidase and the Rooting of Eucalyptus Cuttings after Treatment with Indolebutyric Acid

HUANG Zhuo-Lie[1]，LI Ming[1]，TAN Shao-Man[2]，ZHAN Fu-Jian[1]，
GUAN Ri-Qiang[1]，WU Guang-Hong[1]，LIN Shao-Xiang[1]
（1 *College of Biotechnology*，*South China Agricultural University*，Guangzhou 510642，China；
2 *College of Forestry*，*South China Agricultural University*，Guangzhou 510642，China）

**Abstract**：MLA clone（MLA）of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blade was difficult to root. *E. urophylla* S. T. Blade $U_6$ clone（$U_6$）and *E*. *ABL* 12 $W_5$ clone（$W_5$）were relatively easy to root. The activities of peroxidase（POD）in MLA were higher than those in $U_6$ and $W_5$. After the cuttings of *Eucalyptus* were treated with indolebutyric acid（IBA），the activities of POD（changed regularly）and the content of protein increased at different stages of rooting. The isoenzymes of POD increased after treatment with IBA. The relationship between oxidases and rooting of *Eucalyptus* cuttings was discussed.

**Key words**：Peroxidase；Indolebutyric acid；*Eucalyptus*；Rooting of cuttings

过氧化物酶（peroxidase，POD）在植物的生长、发育中起重要的作用。关于 POD 与植

* 基金项目：广东省重点攻关项目（99M04201G）和雷州林业局资助项目的一部分
收稿日期：2001－02－15，2001－04－10 接受发表
作者简介：黄卓烈（1950－）男，教授，主要从事植物生物化学方面的研究工作。

物生根关系的研究也有一些报道，但说法各异。Ahuja 等（1983）指 出，植物插条的 POD 活性高低关系到其愈伤组织形成的能力大小。Bhattacharya 等（1978）发现，柳树不定根的发生和发育与 POD 的同工酶有着非常密切的联系。Kakkar 等（1986）也指出，在菜豆胚轴切段发根时，POD 的活性水平显著升高。Frenkel 等（1973）发现，在绿豆发根早期首先出现 POD 活性。可见，植物不定根的形成确与 POD 有关。

桉树是我国的主要造林树种。生产上用桉树枝条进行扦插时，插条一般难以生根。对于桉树扦插生根的生理学和生物化学的研究不多。有关 POD 活性变化与桉树插条生根的关系的研究未进行过。本文研究不同桉树在用吲哚丁酸（IBA）处理后，在扦插生根过程中 POD 活性及其同工酶的变化，以揭示这种酶与桉树扦插生根的关系，为桉树生产和深入研究桉树的扦插生根机理提供一定的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试桉树为尾叶桉（*Eucalyptus urophylla* S. T. Blade）MLA 无性系（以下简称为 MLA）和 $U_6$ 无性系（以下简称为 $U_6$），刚果 12 号桉（*E. ABL.* 12）$W_5$ 无性系（以下简称为 $W_5$）。其中 MLA 是难生根桉树，而 $U_6$ 和 $W_5$ 是相对容易生根桉树（李明等，2000）。试验使用其组培苗萌芽条嫩梢作插条进行。扦插基质、插条准备和处理方法见李明等（2000）。将处理好的插条用 0.1%（该浓度是经系列浓度试验后确定的）的吲哚丁酸（IBA）浸其基部 3 min 后取出扦插。扦插方法和插后管理见李明等（2000）。定期取插条基部 3 cm 的茎样进行分析。各种测定均重复 3 次。由于桉树是难生根植物，不用激素处理的对照插条在扦插后 5 d 就死亡，因此本试验无法得到完整的空白对照。

### 1.2 POD 同工酶电泳

POD 同工酶的电泳采用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法，电泳条件和染色按李明等（2000）的方法进行。取根 0.5 g 加酶提取液 3 mL，研磨，10 000 r/min 离心 15 min。取上清液 50 μL 点样。显色完毕后，用蒸馏水冲洗，拍照。

### 1.3 POD 活性和蛋白质含量测定

POD 活性的测定按李明等（2000）的方法进行。以每分每毫克蛋白质使 580 nm 波长处光密度改变 0.1 为一个酶活力单位（U），即“U/min.mg protein”。可溶性蛋白质含量的测定采用 Bradford（1976）的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 IBA 处理 MLA 、$U_6$ 和 $W_5$ 插条生根期间的 POD 活性及可溶性蛋白质含量比较

用 IBA 处理 MLA 插条后，在扦插生根过程中 POD 活性的变化见表 1。结果表明，IBA 处理的 MLA 插条在扦插后生根期间，其 POD 活性在愈伤组织诱导期（0 ~ 20 d）逐渐上升，在不定根形成期（20 ~ 25 d）稍有下降。但在根伸长期（30 ~ 35 d）又恢复上升。表 2 列出了酶活性变化与处理后发根时间的相关性分析。结果表明，POD 活性与 IBA 处理后发根的时间呈极显著正相关。此外，由于 POD 活性变化的决定系数是 0.8037，表明在本试验中，MLA 插条在生根期间 POD 活性的上升有 80.37%的可能性是由 IBA 处理后不同时间决定的。其它原因造成 POD 活性变化的可能性只有 19.63%。

在 $U_6$ 中，用 IBA 处理后 POD 活性的变化与 MLA 有类似的变化（表 1）。相关性分析结果（表 2）表明，POD 活性的变化与 IBA 处理后的时间呈极显著正相关。此外，由于 POD

表 1　IBA 处理 MLA、$U_6$ 和 $W_5$ 插条生根期间的 POD 活性变化

Table 1　Change in POD activities during rooting stages in MLA ，$U_6$ and $W_5$ cuttings treated with IBA

| days after cutting (d) | | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| POD activities (U/min.mg protein) | MLA | 6.51 | 7.00 | 8.64 | 10.21 | 11.66 | 10.07 | 10.88 | 11.76 |
| | $U_6$ | 4.32 | 4.68 | 5.02 | 5.92 | 5.80 | 5.75 | 6.02 | 6.37 |
| | $U_5$ | 3.99 | 4.37 | 4.88 | 7.23 | 7.01 | 6.87 | 7.26 | 7.91 |
| content of protein (mg/g) | MLA | 4.97 | 5.27 | 5.58 | 6.10 | 6.87 | 7.25 | 7.87 | 8.49 |
| | $U_6$ | 7.76 | 8.75 | 8.49 | 8.89 | 9.27 | 9.66 | 10.72 | 10.69 |
| | $W_5$ | 8.02 | 8.23 | 8.68 | 9.56 | 11.28 | 12.00 | 12.57 | 13.42 |

表 2　IBA 处理各树种 POD 活性变化的相关性分析

Table 2　Correlation analysis of the changes of POD activities in clones after treatment with IBA

| clones | correlation coefficient | determination coefficient | Sr | t | $t_{0.05}$ | $t_{0.01}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MLA | 0.8965 | 0.8037 | 0.1809 | 4.956 ** | 2.365 | 3.499 |
| U6 | 0.9337 | 0.8718 | 0.1462 | 6.388 ** | 2.365 | 3.499 |
| W5 | 0.9135 | 0.8345 | 0.1661 | 5.500 ** | 2.365 | 3.499 |

注：表中统计方法参考南京农业大学主编《田间试验和统计方法》第 2 版，农业出版社 1992，214～218.

的决定系数是 0.8718，表明在本试验中，POD 活性的变化有 87.18%的可能性是由 IBA 处理后不同时间作用决定的。其它原因造成酶活性升高的可能性只有 12.82%。这充分说明在 $U_6$ 中，插条不定根的发生和发展与 POD 的活性变化有密切的关系。IBA 处理的 $U_6$ 在扦插生根过程中其插条内 POD 活性变化及可溶性蛋白质含量变化规律基本一致。

用 IBA 处理 $W_5$ 后插条内的 POD 活性的变化结果（表 1）表明，在愈伤组织诱导期，POD 活性相继上升，在不定根形成期，活性稍有下降，进入新根伸长期，活性又回升。相关性分析结果（表 2）表明，酶活性变化与 IBA 处理后的时间呈正相关。显著性测验结果，其正相关性极显著。由于 POD 的决定系数为 0.8345，说明在本试验中，POD 活性变化有 83.45%的可能性是由 IBA 处理后不同作用时间决定的，其它因素造成酶活性变化的可能性只有 16.55%。

## 2.2　不同植物扦插生根期间 POD 的活性变化比较

为了便于比较难易生根树种插条在扦插生根期间的 POD 活性变化，将表 1 所列的数据按照不同树种进行方差分析，以便更容易说明其间的关系。结果（表 3）表明，难易生根桉树在不同生根期间 POD 活性差异都极显著。而不同树种之间的 POD 活性差异非常大，难生根的 MLA 的 POD 活性极显著高于 $U_6$、$W_5$ 的 POD 活性。这从一个侧面揭示了难生根树种与容易生根树种之间的重要区别。

## 2.3　IBA 处理 3 种桉树插条扦插生根期间 POD 同工酶图谱分析

图 1 是用 IBA 处理 MLA 插条后，在扦插生根期间插条茎内 POD 同工酶的变化情况。处理当天，插条茎内有 POD 同工酶带 5 条。到第 5 d，在 M 区就出现了一条新的弱带。以后这条弱带就一直被保留下来，直至第 30 d 的幼根伸长期。

图 2 是用 IBA 处理 $U_6$ 插条后在扦插生根期间 POD 同工酶谱带的变化情况。在处理当天有 4 条酶带，此后在一段时间内没有变化。到第 20 d 时，在 M 区新增一条谱带。这条谱带就一直保留下来。

图 3 是用 IBA 处理 $W_5$ 插条后在扦插生根期间体内 POD 同工酶变化情况。处理当天，插条体内有 4 条酶带。此后在一段时间内没有变化。直到第 30 d 时，在 M 区才新增一条谱带。

表 3 IBA 处理后各树种 POD 活性变化方差分析

Table 3 Variance analysis of POD activity in different species treated with IBA

| source of variant | 自由度 DF | 平方和 SS | 均方 MS | F 值 | $F_{0.05}$ | $F_{0.01}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| among days | 7 | 41.344 | 5.906 | 12.05** | 2.77 | 4.28 |
| among species | 2 | 77.138 | 38.569 | 78.71** | 3.74 | 6.51 |
| error | 14 | 6.863 | 0.490 | | | |
| total variant | 23 | 125.346 | | | | |

注：表中统计方法参考南京农业大学主编《田间试验和统计方法》第 2 版，农业出版社 1992，101～110.

## 3 讨论

IBA 是一种生长素类植物生长调节剂。在本试验中，用 IBA 处理桉树的插条后，MLA、$U_6$ 和 $W_5$ 插条的蛋白质含量都大幅度升高。与此同时，随着蛋白质含量的升高，POD 活性也大幅度升高，这与不定根的发生和发展呈现一致的趋势。据认为，POD 催化底物氧化的产物对不定根的形成是十分必要的（Gonmcalves 等，1998）。本实验的研究结果表明，难生根的 MLA 的 POD 的活性比易生根的 $U_6$、$W_5$ 的 POD 活性高。已知吲哚乙酸（IAA）的一个非常重要的生理功能就是促进不定根的形成（Vesperinas，1998）。而 POD 能氧化 IAA（Gebhardt，1982；Haissig，1986）。难生根植物的 POD 活性高，降解 IAA 的作用强，IAA 被破坏较多，向下输送的 IAA 含量很少，对诱导生根不利。反之，易生根植物 POD 活性低，其降解 IAA 能力较低，而输送到茎基部的 IAA 就较多，对诱导根原基的形成有利。因此，本试验结果表明，在桉树中不定根的发生和发展与 POD 有密切联系。一方面，POD 作用的某些产物可能是不定根发生和发展所必须的辅助因子，能促进不定根形成。

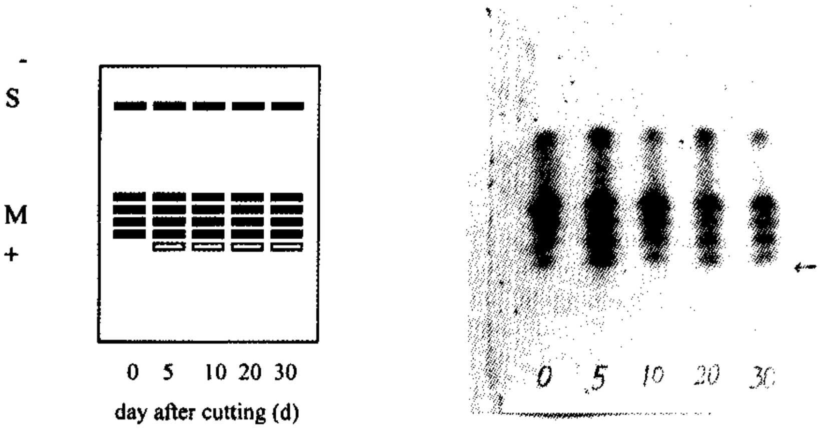


图 1 IBA 处理 MLA 插条生根期间的 POD 同工酶变化图谱（左为示意图，右为照片）

Fig.1 Diagram of POD isoenzymes during rooting stages is MLA treated with IBA

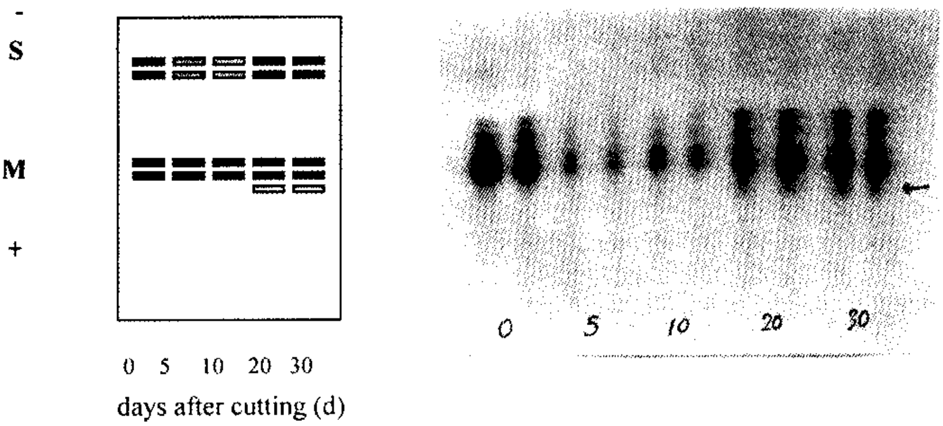


图 2　IBA 处理 $U_6$ 插条后在生根期间的 POD 同工酶变化图谱（左为示意图，右为照片。照片上每种材料设 2 次重复）

Fig.2　Diagram of POD isoenzymes during rooting stages in $U_6$ cuttings treated with IBA

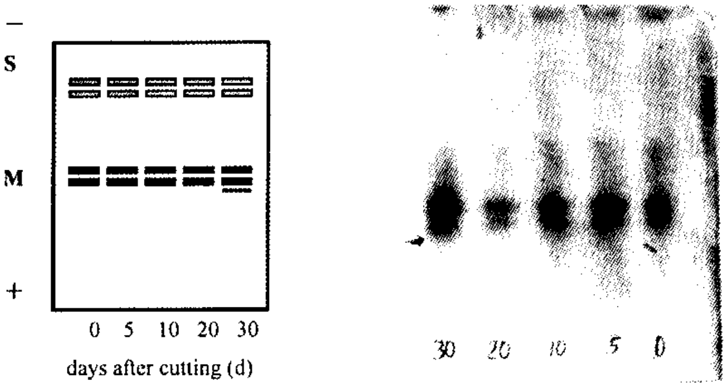


图 3　IBA 处理 $W_5$ 插条生根期间的 POD 同工酶变化图谱（左为示意图，右为照片）

Fig 3　Diagram of POD isoenzymes during rooting stages in $W_5$ cuttings treated with IBA

这在各种桉树插条生根过程中 POD 活性同步升高以及同工酶数量增加表现出来。另一方面，POD 对 IAA 的破坏又对不定根的发生和发展有所制约。这可以从难生根的 MLA 与容易生根的 $U_6$ 和 $W_5$ 的 POD 活性的差异表现出来。因此，POD 对桉树插条的生根的影响是多方面的。其影响机理是较复杂的。要了解其详细机理还要进行深入的研究。

## 〔参　考　文　献〕

Ahuja A，Grewal S，1983．Biochemical markers for *in vitro* initiation of cultures in *Eucalyptus macrorhyncha* and *Eucalyptus youmanni* [J]．*Natl Acad Sci Lett*（India），**6**（6）：185—187

Bhattacharya NC，Bhattacharya S，Nanda KK，1978．Isoenzyme polymorphism of peroxidase，IAA oxidase，catalase and amylase in rooting etiolated stem segments of *Salix tetrasperma* [J]．*Biochem Physiol Pflanz*，**172**（5），439—452

Bradford MM，1977. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*，**72** (2)：248—254

Frenkel C，Hess CE，1973. Isozymic changes in relation to root initiation in mung bean [J]. *Can J Bot*，**52**：295—297

Gebhardt K，1982. Activation of indole-3-acetic acid oxidase from horseradish and prunus by phenols and hydrogen peroxide [J]. *Plant Growth Regul*，**1** (2)：73—84

Goncalves JC，Diogo G，Amancio S，1998. In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*)：Effects of rooting treatments on plant survival，peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation [J]. *Sci Hort*，**72** (3~4)：265—272

Haissig BE，1986. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings [A]. In：Jackson M B (ed.) New Root Formation in Plant and Cuttings [C]. Lancaster：Martinus Nijhoff，141—189

Kakkar RK，Rai VK，1986. Changes in peroxidase and IAA oxidase activity of *Phaseolus vulgaris* hypocotyl cuttings during root initiation and emergence [J]. *Indian J Exp Biol*，**24** (6)：381—383

Li M (李明)，Huang XL (黄卓烈)，Tan SM (谭绍满)，*et al*，2000. Comparative studies on the activity and isoenzymes of peroxidase in dificult-and easy-to-root *Eucalyptus* species [J]. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报)，**21** (3)：56—59

Vesperinas ES，1998. In vitro root induction in hypocotyl and plumule explants of *Helianthus annuus* [J]. *Environ Exp Bot*，**39** (3)：271—277